

## Élimination de l'ARN par une digestion double RNase

### Introduction

La quantification de l'ADN par absorption à 260 nm avec un spectrophotomètre est simple et rapide, mais peut être moins fiable que les méthodes de quantification qui utilisent des colorants fluorescents comme le SYBR<sup>®</sup> Green ou le PicoGreen<sup>®</sup> (sondes moléculaires). La raison de cette fiabilité moindre est la présence de l'ARN qui est co-purifié avec l'ADN et absorbe à 260 nm. Cela peut entraîner une surestimation de la quantité d'ADN. Ce protocole décrit l'utilisation de la digestion double RNase pour éliminer l'ARN des échantillons Oragene. Après ce traitement à la RNase, les échantillons d'ADN donneront des résultats de quantification comparables par absorption ou par fluorescence.

### Digestion double RNase

Ce protocole utilise deux ribonucléases pour une double digestion de l'ARN parce qu'un traitement avec la ribonucléase A seule n'est pas suffisant pour dégrader l'ARN en fragments solubles dans l'alcool. Cela s'explique parce que la ribonucléase A clive seulement au niveau des nucléotides U et C, laissant des fragments suffisamment longs pour précipiter à l'alcool. En ajoutant la ribonucléase T1 (qui clive au niveau des nucléotides G), l'ARN peut être digéré en très petits fragments qui ne précipitent pas à l'alcool.

### Équipement et réactifs

- Ribonucléase A (concentration de la solution mère : 1 mg/ml) (par ex., Sigma-Aldrich, Cat. N° R4875)
- Ribonucléase T1 (concentration de la solution mère : 6 000 unités/ml) (par ex., Sigma-Aldrich, Cat. N° R1003)
- Chlorure de sodium (NaCl) (concentration de la solution mère : 5 M)
- Éthanol (95 à 100 %) à température ambiante
- Tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ou autre tampon standard
- Microcentrifugeuse capable de générer 13 000×g
- Bain-marie ou incubateur à air, à 37 °C

### Méthode

1. Purifier un aliquot de 500 µl de l'échantillon Oragene/salive suivant le protocole standard Oragene DNA Purification (réf.1).
2. Resuspendre le culot d'ADN dans 500 µl de 1x TE.
3. Ajouter 5 µl de ribonucléase A (concentration finale de 10 µg/ml), et ajouter également 2 µl de ribonucléase T1 (concentration finale de 25 unités/ml).
4. Incuber 30 min à 37 °C.
5. Ajouter 10 µl de NaCl (concentration finale de 0,1 M) ainsi que 1 000 µl d'éthanol à 95 % (deux volumes).
6. Bien mélanger et incuber 10 minutes à température ambiante.
7. Récupérer le précipité d'ADN par centrifugation 2 minutes à température ambiante à 13 000×g.
8. Éliminer le surnageant et resuspendre le culot d'ADN dans 500 µl de 1x TE.

### Références

1. Protocole de laboratoire pour la purification manuelle d'ADN à partir de 0,5 ml d'Oragene<sup>®</sup>•DNA/salive. PD-PR-006, 2008